

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11066:2016

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM CHỨC NĂNG –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG GLUCOSAMIN
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LÒNG HIỆU NĂNG CAO**

*Dietary supplements – Determination of glucosamine content
by high performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2016

Lời nói đầu

TCVN 11066:2016 được xây dựng trên cơ sở AOAC 2005.01 *Glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride. High-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization*;

TCVN 11066:2016 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm chức năng – Xác định hàm lượng glucosamin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Dietary supplements – Determination of glucosamine content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để xác định hàm lượng glucosamin trong nguyên liệu và các sản phẩm thực phẩm chức năng.

2 Nguyên tắc

Hòa tan mẫu thử trong nước, thêm triethylamin (TEA) để chuyển glucosamin hydroclorua (G·HCl) hoặc glucosamin sulfat ($2G \cdot H_2SO_4$) về glucosamin dạng bazơ tự do (GFB). Glucosamin dạng bazơ tự do được tạo dẫn xuất trước cột bằng *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyloxy succinimid. Dẫn xuất được tách trên hệ thống HPLC và xác định bằng detector UV tại bước sóng 265 nm. Glucosamin có hai đồng phân lập thể tự nhiên (dạng α và β), tạo nên hai pic sắc ký trên sắc đồ. Tính hàm lượng glucosamin dạng bazơ tự do trong mẫu dựa trên tổng diện tích của hai pic này.

3 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương. Nước sử dụng phải là nước đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Axetonitril.

3.2 Axit trifloaxetic (TFA), tinh khiết ($\geq 99\%$).

3.3 Triethylamin (TEA), tinh khiết ($\geq 99\%$).

TCVN 11066:2016

3.4 N-9-fluorenylmethoxycarbonyloxy succinimid (Fmoc-Su) ¹⁾, tinh khiết ($\geq 97\%$).

3.5 Dung dịch Fmoc-Su, 15 mM

Hòa tan 50 mg $\pm$ 1,0 mg Fmoc-Su (3.4) trong 10 ml axetonitril (3.1). Chuẩn bị dung dịch mới khi sử dụng.

3.6 Pha động

a) Pha động A (dung dịch TFA 0,05 %, pH 2,4): Thêm 0,5 ml TFA (3.2) vào bình định mức 1 000 ml chứa sẵn khoảng 900 ml nước, thêm nước vừa đủ 1 000 ml và trộn đều. Chính pH của dung dịch đến 2,4. Lọc qua màng lọc nylon 0,45 μ m (4.14) trước khi dùng.

b) Pha động B: Axetonitril.

3.7 Chất chuẩn glucosamin hydroclorua (G·HCl) ²⁾, tinh khiết ($\geq 99\%$).

3.8 Dung dịch chuẩn gốc glucosamin hydroclorua

Cân 240 mg G·HCl (3.7), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 100 ml (4.8). Lấy chính xác 750 μ l TEA (3.3) vào bình, thêm nước đến vạch và trộn.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

4.1 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao ³⁾, gồm bơm, bộ loại khí, bộ bơm mẫu tự động, bộ ổn định buồng cột, detector UV-Vis (hoặc PDA), máy tính có phần mềm kiểm soát và phân tích dữ liệu.

4.2 Cột phân tích, Phenomenex Prodigy (MidBore™) ODS-3 ⁴⁾ 100 Å (kích thước 150 mm x 3,2 mm, cỡ hạt 5 μ m), bao gồm bảo vệ cột: Phenomenex Prodigy (Security Guard™) Cartridges ODS-3 ⁴⁾ 100 Å (kích thước 4 mm x 3,0 mm).

CHÚ THÍCH: Loại cột, chiều dài và đường kính của cột có thể được thay đổi theo kỹ thuật sử dụng HPLC.

4.3 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

¹⁾ Có thể sử dụng sản phẩm của Sigma, St. Louis, MO, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

²⁾ Có thể sử dụng sản phẩm của Lancaster, Windham, NH, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

³⁾ Có thể sử dụng Agilent HPLC 1100 series của Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

⁴⁾ Sản phẩm của Phenomenex, Torrance, CA, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

- 4.4 Bể rung siêu âm, có thể duy trì nhiệt độ 50 °C.
- 4.5 Máy nghiền, có khả năng nghiền mẫu thử lọt qua sàng có cỡ lỗ 0,5 mm.
- 4.6 Máy lắc vortex.
- 4.7 Máy đo pH.
- 4.8 Bình định mức, dung tích 5, 100 và 1 000 ml.
- 4.9 Pipet thủy tinh, dung tích 10 ml.
- 4.10 Pipet tự động, có thể phân phối các thể tích từ 50 µl đến 200 µl và từ 500 µl đến 2 500 µl, đã được hiệu chuẩn.
- 4.11 Màng lọc xyranh, bằng PTFE, kích thước 13 mm, cỡ lỗ 0,45 µm.
- 4.12 Màng lọc xyranh, bằng PTFE, kích thước 25 mm, cỡ lỗ 0,45 µm.
- 4.13 Lọ đựng mẫu cho HPLC, có nắp vặn được phủ teflon.
- 4.14 Bộ lọc dung môi sắc ký, sử dụng màng nylon cỡ lỗ 0,45 µm.
- 4.15 Xyranh, dung tích 3 ml.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

- a) Mẫu nguyên liệu: nghiền nếu cần.
- b) Mẫu dạng viên nén: cân 20 viên, chính xác đến 0,1 mg và tính khối lượng trung bình viên. Nghiền và trộn đều.
- c) Mẫu dạng viên nang: lấy 20 viên, bỏ vỏ nang rồi cân phần mẫu trong nang, tính khối lượng trung bình mỗi viên, chính xác đến 0,1 mg. Nghiền và trộn đều.
- d) Mẫu dạng lỏng: trộn đều mẫu.

6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

Cân hoặc đong chính xác khối lượng mẫu đã chuẩn bị ở 6.1 theo Bảng 1 vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm khoảng 80 ml nước, trộn đều bằng máy lắc vortex (4.6) trong 1 min, rung siêu âm bình trong 5 min hoặc cho đến khi tan hoàn toàn.

CHÚ Ý: Một số tá dược của sản phẩm không tan, ví dụ: silic dioxit.

Bảng 1 – Khối lượng/thể tích phần mẫu thử cần lấy

Dạng mẫu thử	Khối lượng/thể tích phần mẫu thử
Mẫu thử có công bố hàm lượng glucosamin	Tính toán theo công bố để thu được hàm lượng glucosamin trong mẫu thử tương đương 240 mg G·HCl hoặc 340 mg 2G·H ₂ SO ₄
Mẫu thử không công bố hàm lượng glucosamin:	
– mẫu nguyên liệu thô	300 mg
– mẫu dạng viên nén	430 mg
– mẫu dạng viên nang	500 mg
– mẫu dạng hỗn hợp bột uống	2 000 mg
– mẫu dạng lỏng	10 ml

Lấy chính xác 750 µl TEA (3.3) vào mỗi bình, lắc và thêm nước đến vạch. Lọc khoảng 1,5 ml mỗi dung dịch qua màng lọc xyranh (4.12) vào lọ đựng mẫu (4.13).

6.3 Tạo dẫn xuất

Việc tạo dẫn xuất đối với các chất chuẩn và mẫu thử cần được thực hiện đồng thời.

Lấy chính xác lần lượt 50, 125, 200 µl dung dịch chuẩn gốc (3.8) và 125 µl dung dịch thử đã chuẩn bị (6.2), cho vào các bình định mức 5 ml (4.8). Thêm 500 µl dung dịch FMOC-Su 15 mM (3.5), đậy kín và trộn đều bằng máy vortex (4.6), rung siêu âm ở 50 °C trong 30 min. Lấy bình ra khỏi bể rung siêu âm, để nguội đến nhiệt độ phòng và thêm hỗn hợp pha động A : B (tỉ lệ thể tích 1 : 1) (3.6) đến vạch. Lắc đều trên máy lắc vortex (4.6), lọc qua màng lọc xyranh (4.11) vào lọ đựng mẫu (4.13).

6.4 Xác định

6.4.1 Điều kiện vận hành HPLC

- Pha động: Dung dịch TFA 0,05 % : axetonitril theo chương trình gradient tỷ lệ pha động:

Thời gian, min	Tỷ lệ pha động (A : B)
từ 0,0 đến 6,0	Đẳng dòng 70 : 30
từ 6,0 đến 11,0	Thay đổi đến 0 : 100
từ 11,0 đến 13,0	Thay đổi về 70 : 30
từ 13,0 đến 15,0	Cân bằng 70 : 30

- Detector: PDA hoặc UV-Vis, bước sóng 265 nm;
- Thể tích mẫu bơm: 10 µl;
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/min;
- Nhiệt độ buồng cột: 30 °C.

CHÚ THÍCH: Các thông số về tỷ lệ pha động, thể tích mẫu bơm, tốc độ dòng, nhiệt độ buồng cột có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào điều kiện thực tế của thiết bị HPLC được sử dụng.

6.4.2 Kiểm tra sự ổn định của hệ thống

Cân bằng hệ thống bằng dung môi pha động ít nhất 30 min, sau đó bơm lặp lại năm lần dung dịch chuẩn làm việc G·HCl (chuẩn có nồng độ ở giữa) đã được tạo dẫn xuất theo 6.3.

- Thời gian lưu của pic đồng phân rửa giải trước không được < 4 min;
- Thời gian lưu tương đối R_r của pic rửa giải thứ hai so với pic rửa giải thứ nhất phải là 1,2 ($R_r = t_2/t_1$);
- Hệ số kéo đuôi pic (T) không được > 2,0. Tính giá trị T theo Công thức (1):

$$T = W_{0,05} / 2f \quad (1)$$

trong đó:

$W_{0,05}$ là độ rộng của pic được đo tại điểm 5 % chiều cao pic tính từ đường nền;

f là khoảng cách từ đường vuông góc hạ từ đỉnh pic đến điểm 5 % chiều cao pic.

- Độ lệch chuẩn tương đối của tổng diện tích hai pic giữa năm lần bơm không được > 2 %.

TCVN 11066:2016

6.4.3 Dựng đường chuẩn

Sau khi thiết bị đã ổn định, tiến hành bơm lần lượt các dung dịch chuẩn làm việc đã được tạo dẫn xuất theo 6.3 vào hệ thống HPLC.

Xác định diện tích hai pic, dựng đường chuẩn dựa vào tổng diện tích hai pic và nồng độ chuẩn làm việc tương ứng.

6.4.4 Phân tích mẫu

Bơm mẫu thử với cùng điều kiện như bơm dung dịch chuẩn, xác định diện tích các pic.

7 Tính kết quả

7.1 Nồng độ GFB trong dung dịch chuẩn làm việc

Nồng độ GFB trong dung dịch chuẩn làm việc sau khi tạo dẫn xuất, STD_n , tính bằng miligam trên millilit (mg/ml), theo Công thức (2):

$$STD_n = 0,83091 \times d \times w \times F \quad (2)$$

Trong đó:

n là chuẩn tương ứng 1, 2, 3;

0,83091 là hệ số chuyển đổi từ G·HCl sang GFB;

d là hệ số pha loãng, tính theo Công thức (3):

$$d = \frac{V_0}{V_1 \times V_2} \quad (3)$$

Trong đó:

V_0 tương ứng bằng 0,050; 0,125; 0,200 ml;

$V_1 = 100$ ml;

$V_2 = 5$ ml;

w là khối lượng cân của chuẩn, tính bằng miligam (mg);

F là độ tinh khiết của chuẩn.

7.2 Hàm lượng GFB trong mẫu thử

Hàm lượng GFB trong mẫu thử dạng rắn, $X_{GFB(1)}$, tính bằng % khối lượng, theo Công thức (4):

$$X_{GFB(1)} = \frac{C}{W \times d} \times 100 \quad (4)$$

Hàm lượng GFB trong mẫu thử dạng lỏng, $X_{GFB(2)}$, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml), theo Công thức (5):

$$X_{GFB(2)} = \frac{C}{V \times d} \times 100 \quad (5)$$

Trong đó:

C là nồng độ GFB xác định được từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml);

w là khối lượng mẫu thử dạng rắn, tính bằng miligam (mg);

V là thể tích mẫu thử dạng lỏng, tính bằng mililit (ml);

d là hệ số pha loãng, tính được theo Công thức (3) với $V_0 = 0,125$ ml.

7.3 Hàm lượng G·HCl trong mẫu thử

Hàm lượng G·HCl trong mẫu thử dạng rắn, $X_{G \cdot HCl(1)}$, tính bằng % khối lượng, theo Công thức (6):

$$X_{G \cdot HCl(1)} = \frac{C}{0,83091 \times W \times d} \times 100 \quad (6)$$

Hàm lượng G·HCl trong mẫu thử dạng lỏng, $X_{G \cdot HCl(2)}$, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml), theo Công thức (7):

$$X_{G \cdot HCl(2)} = \frac{C}{0,83091 \times V \times d} \times 100 \quad (7)$$

Trong đó:

C , d , w và V tương tự 7.2;

0,83091 là hệ số chuyển đổi từ G·HCl sang GFB.

7.4 Hàm lượng 2GFB·H₂SO₄ trong mẫu thử

Hàm lượng 2G·H₂SO₄ trong mẫu thử dạng rắn, $X_{G \cdot sulfate(1)}$, tính bằng % khối lượng, theo Công thức (8):

TCVN 11066:2016

$$X_{G-sulfat(1)} = \frac{C}{0,78511 \times w \times d} \times 100 \quad (8)$$

Hàm lượng $2G \cdot H_2SO_4$ trong mẫu thử dạng lỏng, $X_{G-sulfat(2)}$, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml), theo Công thức (9):

$$X_{G-sulfat(2)} = \frac{C}{0,78511 \times V \times d} \times 100 \quad (9)$$

Trong đó:

C , d , w và V tương tự 7.2;

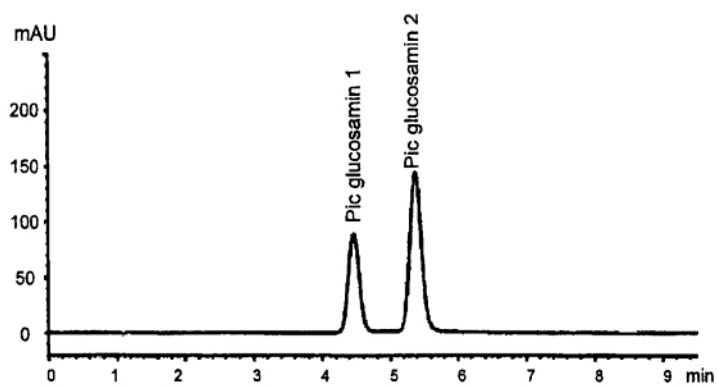
0,78511 là hệ số chuyển đổi từ $2G \cdot H_2SO_4$ sang GFB.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)
Ví dụ về sắc đồ



Hình A.1 – Sắc ký đồ mẫu viên nang chứa glucosamin

Phụ lục B

(Tham khảo)

Kết quả thử liên phòng thử nghiệm

Bảng B.1 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Mã mẫu	Giá trị GFB trung bình, %	SD_r	RSD_R , %	$PRSD_R$, %	Giá trị HorRat, $\%RSD_R/\%PRSD_R$	Số PTN ngoại lệ	Số PTN tham gia
G3	59,1	1,0	1,7	2,2	0,8	0	12
G4	84,5	2,1	2,5	2,1	1,2	0	12
G5	83,7	1,5	1,8	2,1	0,9	0	12
G6	10,0	0,4	4,0	2,8	1,5	0	12
G7	53,5	2,0	3,7	2,2	1,7	0	12
G8	27,4	1,0	3,6	2,4	1,5	0	12
G9	2,45	0,3	1,2	2,5	0,5	0	12
G10	50,0	1,0	2,0	2,2	0,9	0	12
G13	49,9	1,0	2,0	2,2	0,9	0	12
CHÚ THÍCH: SD_r độ lệch chuẩn tái lập; RSD_R độ lệch chuẩn tương đối tái lập; $PRSD_R$ độ lệch chuẩn tương đối tái lập dự đoán.							